

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-534846
(P2017-534846A)

(43) 公表日 平成29年11月24日(2017.11.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 E	2GO43
GO 2 B 21/00 (2006.01)	GO 2 B 21/00	2GO45
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F	2HO52
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	4BO29
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	4BO63

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-514482 (P2017-514482)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月4日 (2015.9.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年5月15日 (2017.5.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/048519
 (87) 国際公開番号 WO2016/043991
 (87) 国際公開日 平成28年3月24日 (2016.3.24)
 (31) 優先権主張番号 14/487,997
 (32) 優先日 平成26年9月16日 (2014.9.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510218043
 ローレンス リバモア ナショナル セキ
 ュリティー, エルエルシー
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州, リバ
 モア, スイート 204, ファースト
 ストリート 2300
 (71) 出願人 301043487
 ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシ
 ティ・オブ・カリフォルニア
 The Regents of the
 University of Calif
 ornia
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 607, オークランド, フランクリン・ス
 トリート 1111番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光剤による染色後に紫外線励起を利用した蛍光顕微鏡検査によって組織内の撮像深度を制御するシステムおよび方法

(57) 【要約】

本開示は、組織標本を分析する方法に関する。一実装において、上記方法は、組織サンプルを取得する工程と、上記組織サンプルの細胞下区画のコントラストを高めるため、上記サンプルを造影剤としての1つ以上の蛍光物質に晒す工程を含む。上記組織サンプルは、約200nmから約400nmの波長であって、上記組織サンプルの表面下へ所定の深度のみ透過するよう選択される波長を有する紫外線(UV)が照射される。異なる画像パラメータにより取得された画像間で行われる画像間動作によって、不要な画像成分が除去されることにより、画像品質の向上が可能となる。上記組織サンプルの撮像に顕微鏡を使用してもよく、その画像を、カメラを使用する画像取得システムに提供してもよい。上記画像取得システムは、処理および表示を行うため、対応する画像を作成し、表示システムに送信してもよい。

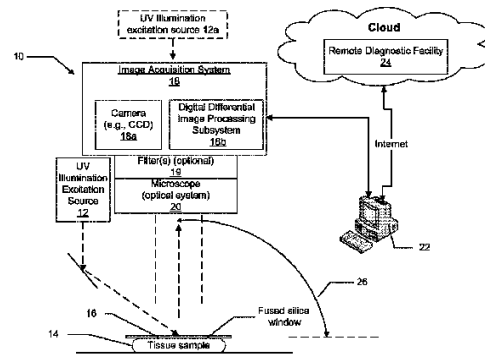


FIGURE 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織を分析する方法であって、
 組織サンプルを取得する工程と、
 上記組織サンプルを、組織または細胞成分に選択的に蓄積する蛍光染料または蛍光標識分子プローブを含む1つ以上の蛍光物質に晒す工程と、
 約200nmから約400nmの波長であって、上記組織サンプルにおける紫外線の透過が、表面からの選択された深度の近傍のみに制限されるように選択される波長を有する紫外線光源を、上記組織サンプルの表面に照射するために照明励起光源を使用する工程と、
 上記組織サンプルを撮像するために顕微鏡光学システムを使用する工程と、
 1つ以上の画像を記録するため、上記顕微鏡光学システムから光情報を受け取る画像取得システムを使用する工程と、
 分析のために上記画像の処理および表示を行うため、上記画像取得システムと通信する表示システムを使用する工程と、
 を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

上記組織サンプルへの紫外線の照射は、
 350nm、
 340nm、
 330nm、
 320nm、
 310nm、
 290nm、
 280nm、
 270nm、
 260nm、
 250nm、
 245nm、
 240nm、
 235nm、
 230nm、
 225nm、
 220nm、
 210nm、
 200nm
 を中心とするまたはそれら付近の光の波長より選択される波長域を有する紫外線光源を使用する工程を含み、
 上記紫外線光源は、
 LED、
 レーザ、
 波長可変レーザ、または
 連続レーザ光源、アーク灯、レーザ点火アーク灯、クリプトン臭素エキシマランプ、
 または所望のスペクトル域の十分な明るさを持つ他の光源の少なくとも1つを含む連続光源、
 の少なくとも1つを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

20

30

40

【請求項 3】

上記サンプルは、石英、溶融シリカ、サファイア、またはTPX（登録商標）ポリメチルペンテンを含む紫外線透過プラスチックを含み得る紫外線透過材により形成される支持体によって支持され、

50

上記支持体は、

接触面において良好な光学特性を確保するように上記サンプルを押し付けることができる平面窓として構成することができる支持体、または、

場合によっては使い捨て可能であり、上記組織を導入することができるキュベット形状部材として構成することができ、周囲の撮像のために4つ以上の平坦または場合によっては湾曲した表面を提供する支持体、

の少なくともいずれかであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】

上記1つ以上の蛍光染料または蛍光標識分子プローブは、通常は顕微鏡で観察される組織または細胞成分であって、

細胞核、

細胞質、

細胞膜、および

ミトコンドリア、

の少なくとも1つからなる組織または細胞成分のコントラストを高めるように選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項5】

上記1つ以上の蛍光染料または蛍光標識分子プローブは、顕微鏡で観察される組織または細胞成分であって、

細胞内小器官、

脂質、

コラーゲンおよび細胞外マトリックスを含む結合組織を少なくとも1つ含む細胞外組織成分、

嚢胞内容物、

異物、

感染因子、

色素、

配向用外因性マーキング染料、

の少なくとも1つからなる組織または細胞成分のコントラストを高めるように選択され、分子プローブの場合は、

特異タンパク質、

翻訳後修飾、

遺伝子、染色体領域、またはDNA成分を含む特異DNAまたはRNA配列、

RNA転写、コーディング、非コーディング、および

脂質ラフト、

であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項6】

上記蛍光物質は、350nmから200nmのスペクトル域において十分に励起可能であり、350nmから950nmのスペクトル域において有用な発光帯域を有する組織学的または組織化学的蛍光染料を含み、上記蛍光物質は、エオシン染料類、トルイジンプルー、メチレンブルー、DAPI、アクリジンオレンジ、DRAQ5、Hoechst 33342および33528、カルセイン-AM、プロピジウムヨウ化物、ナイルブルー、ナイルレッド、オイルレッドO、コンゴレッド、ファストグリーンFCF、DiI、DiO、DiD等、TOTO(登録商標)、YO-PRO(登録商標)、ニュートラルレッド、ニュークリアファストレッド、ピロニンY、酸性フクシン、アストラゾン類染料、MitoTrackerおよび他のミトコンドリア染料、LysoTrackerおよび他のリソソーム染料、サフラニン染料、チオフラビン染料、蛍光ファロイジン、形質膜染料、および感染因子に結合する蛍光化合物、の少なくとも1つを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項7】

10

20

30

40

50

抗体および関連分子、アプタマー、Somamers (商標)、核酸オリゴマー、LNAを含む分子プローブは、直接または間接的に蛍光標識と複合体を形成し、上記蛍光標識は、カーボンナノチューブ；カーボン量子ドット；フルオレセイン、ローダミン、アレクサ染料、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、テキサスレッド、クマリン系蛍光物質、IRDye800、インドシアニンググリーン、bodipy、DyLight染料、オレゴングリーン、フィコエリトリン)を含む有機蛍光標識；希土類元素；半導体量子ドット；有機量子ドット；ポリマードット(pDot)；シリカビーズ、ポリマーソーム、ポルフィリン系ミセルおよびリポソームを含む蛍光ナノ粒子；およびFRET系染色複合体；の標識クラスを少なくとも1つ含む部材を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項8】

上記1つ以上の蛍光物質は、細胞外成分、細胞、または細胞成分内の特定の分子に結合する分子プローブに連結する、または正常上皮または間質、または感染因子に対して異なる細胞型によって選択的に吸収されるまたは特異的に処理される方法であって、

標識化処理は、患者が、所望の組織または細胞特異性を有する1つ以上の蛍光化合物を投与される場合、患者(生体内)において組織の切除前に行われる、

標識化処理は、組織の切除または採取後、生体外短期培養中に、酸素を含む温かい組織培地で保持することを含む、細胞の生存性を支持可能な状況下で行われる、または、

標識化処理は、細胞または組織において、免疫蛍光検査によりプローブに晒す、または原位置ハイブリダイゼーション状態を含む、生存性を要求しない状況下で行われる、ことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項9】

画像取得システムを使用する工程は、

CCD、cMOS、ICCD、またはEMCCDカメラ等の少なくとも1つを含む二次元エリアセンサであって、天然組織分子の蛍光および/または造影剤の蛍光を使用して組織サンプルの領域から少なくとも一つの画像を記録する二次元エリアセンサ、または、

天然組織分子の蛍光および/または造影剤の蛍光を使用して組織サンプルの領域から少なくとも一つの画像を生成するために、上記組織サンプルの切片を点ごとに走査する点検出器、または、

天然組織分子の蛍光および/または造影剤の蛍光を使用して組織サンプルの切片から少なくとも一つの画像を生成するために、上記組織サンプルの切片を線ごとに走査する線検出器、

の少なくとも1つとして動作することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項10】

上記画像取得システムを使用する工程は、後に連結することで上記組織サンプルのより大きい切片または上記組織サンプル全体の1つの拡大画像を形成するように、上記組織サンプルの異なる切片から取得した複数の画像を提供する工程を含むことを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項11】

上記紫外線の上記組織サンプルにおける透過深度は、ひとつには上記照明励起光源を上記組織サンプルの表面に対して所望の入射角に配置することによって、またひとつには上記励起波長を調整することによって、制御されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項12】

上記入射角は、上記組織サンプルの表面に対して40°から80°の間であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項13】

上記入射角は、上記組織サンプルの表面に対して90°以下であることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項14】

上記紫外線の上記組織サンプルの表面下への透過深度は、約5マイクロメートルから約

10

20

30

40

50

25 マイクロメートルの間であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項15】

上記透過深度は、約10マイクロメートルであることを特徴とする請求項14に記載の方法。

【請求項16】

上記画像取得システムを使用する工程の動作は、焦点信号と不要な信号成分との相対寄与が異なる複数の画像を取得する工程を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項17】

複数の画像を取得する工程の動作は、

a) 撮像のための、2つ以上の励起波長および1つの発光スペクトル帯域を使用して、
画像を取得する工程と、

b) 同じ励起波長またはスペクトル帯域を使用して、2つ以上の異なる発光スペクトル帯域を取得する工程と、

c) 撮像のための、2つ以上の励起波長および2つ以上の異なる発光スペクトル帯域を使用して、画像を取得する工程と、

d) 同じ励起波長を使用する2つ以上の光励起入射角を使用して、画像を取得する工程と、

e) 異なる励起波長を使用する2つ以上の光励起入射角を使用して、画像を取得する工程と、

f) 撮像のための、同じ発光スペクトル帯域を使用する2つ以上の光励起入射角を使用して、画像を取得する工程と、

g) 撮像のための、異なる発光スペクトル帯域を使用する2つ以上の光励起入射角を使用して、画像を取得する工程と、

h) 撮像のために使用される、発光の同じ偏光状態を使用する励起の2つ以上の偏光状態を使用して、画像を取得する工程と、

i) 撮像のための、発光の異なる偏光状態を使用する励起の1つの偏光状態を取得する工程と、

j) 撮像のための、異なる発光スペクトル帯域を使用する特定の入射角における2つ以上の光励起回転角を使用して、画像を取得する工程と、

k) a) から j) の組み合わせを使用する工程と、

l) 様々な空間変調照明(励起)パターンを使用して、2つ以上の画像を取得する工程と、

m) 画像処理を介して、より深いまたは表面的な信号を除外するために使用される画像を提供するように構成された、異なる空間変調照明(励起)構造を使用して、画像の配列を取得する工程と、

の少なくとも1つを含むことを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項18】

組織サンプルを分析するシステムであって、上記組織サンプルは、組織または細胞成分に選択的に蓄積する蛍光染料または蛍光標識分子プローブを含む1つ以上の蛍光物質に晒された組織サンプルであり、上記システムは、

上記組織サンプルにおける紫外線の透過が、表面からの選択された深度の近傍のみに制限されるように選択される波長を有する紫外線を、上記組織サンプルの表面に照射するように構成された照明励起光源と、

上記組織サンプルに関する光情報を提供する顕微鏡と、

上記顕微鏡によって提供された上記光情報から1つ以上の画像を生成する画像取得システムと、

分析のために上記1つ以上の画像の処理および表示を行うため、上記画像取得システムと通信する表示システムと、

を含むことを特徴とするシステム。

【請求項19】

10

20

30

40

50

上記組織サンプルへの紫外線の照射は、

350 nm、
 340 nm、
 330 nm、
 320 nm、
 310 nm、
 290 nm、
 280 nm、
 270 nm、
 260 nm、
 250 nm、
 245 nm、
 240 nm、
 235 nm、
 230 nm、
 225 nm、
 220 nm、
 210 nm、
 200 nm

10

の少なくとも1つを中心とする光の波長より選択される波長域を有する紫外線光源を含み

20

上記紫外線光源は、

LED、

レーザ、

波長可変レーザ、または

連続レーザ光源、アーク灯、レーザ点火アーク灯、クリプトン臭素エキシマランプ、
 または所望のスペクトル域の十分な明るさを持つ別の光源のうち、少なくとも1つを含む
 連続光源、

の少なくとも1つを含むことを特徴とする請求項18に記載のシステム。

30

【請求項20】

上記サンプルは、石英、熔融シリカ、サファイア、またはTPX（登録商標）ポリメチ
 ルペンテンを含む紫外線透過プラスチックの少なくとも1つを含む紫外線透過材により形
 成される支持体によって支持され、

上記支持体は、

接触面において良好な光学特性を確保するように上記サンプルを押し付けることができ
 る平面窓として構成することができる支持体、または、

場合によっては使い捨て可能であり、上記組織を導入することができるキュベット形状
 部材として構成することができ、周囲の撮像のために、4つ以上の平坦または場合によっ
 ては湾曲した表面を提供する支持体、

の少なくともいずれかであることを特徴とする請求項18に記載のシステム。

40

【請求項21】

上記画像取得システムは、焦点信号と不要な信号成分との相対寄与が異なる複数の画像
 を取得するように構成され、上記複数の画像は、

a) 撮像のための、2つ以上の励起波長および1つの発光スペクトル帯域を使用する画
 像と、

b) 同じ励起波長またはスペクトル帯域を使用する2つ以上の異なる発光スペクトル帯
 域と、

c) 撮像のための、2つ以上の励起波長および2つ以上の異なる発光スペクトル帯域を
 使用する画像と、

d) 同じ励起波長を使用する2つ以上の光励起入射角を使用する画像と、

50

- e) 異なる励起波長を使用する2つ以上の光励起入射角を使用する画像と、
 - f) 撮像のための、同じ発光スペクトル帯域を使用する2つ以上の光励起入射角を使用する画像と、
 - g) 撮像のための、異なる発光スペクトル帯域を使用する2つ以上の光励起入射角を使用する画像と、
 - h) 撮像のために使用される、発光の同じ偏光状態を使用する励起の2つ以上の偏光状態を使用する画像と、
 - i) 撮像のための、発光の異なる偏光状態を使用する励起の1つの偏光状態と、
 - j) 撮像のための、異なる発光スペクトル帯域を使用する、特定の入射角における2つ以上の光励起回転角を使用する画像と、
 - k) a) から j) の組み合わせを使用する工程と、
 - l) 様々な空間変調照明(励起)パターンを使用する2つ以上の画像と、
 - m) 画像処理を介して、より深いまたは表面的な信号を除外するために使用される画像を提供するように構成された、異なる空間変調照明(励起)構造を使用する画像の配列と、
- の少なくとも1つを含むことを特徴とする請求項18に記載のシステム。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、紫外線等の短波長励起による蛍光顕微鏡検査によって、人間および動物の組織の構造的および分子的撮像を行うためのシステムおよび方法に関する。より詳細には、本開示は、組織サンプルに対するホルマリン固定パラフィン包埋(F F P E)およびその後のマイクローム切片化、または凍結および切片化を行う必要がなく、厚い組織サンプルに対して光学的に切片化を行い、表面近傍組織のマイクロ構造の高解像度画像を得ることができるシステムおよび方法に関する。さらに、上記システムおよび方法は、従来のも、または新たな蛍光染色液および標識とともに使用することができ、診断用組織、組織組成、および腫瘍細胞の有無の少なくともいずれかを調べるための生検標本の切除断端範囲を監視する等、外科的ガイダンスに関する効果的な分析が可能となる。

20

【背景技術】

【0002】

本セクションでは本開示に関連する背景情報を説明するにすぎず、先行技術であるとは限らない。

30

【0003】

細胞レベルでの組織の機能的および構造的な撮像を可能にする技術は、様々な分野において非常に重要である。具体的には、臨床診療の分野で、長きにわたり基準になる検査とされている病理組織学的診断は、生検または外科的切除における薄い染色された組織標本の撮像、検死または部検に由来するサンプル、完了するまでに数時間から数日を要する可能性のある処理、に基づいて行われる。組織構造、遺伝子、または形質に関する情報は、生体内で、または標本を除去した直後に取得するのが理想的である。本明細書では、切除断端評価、生検の品質管理、迅速な診断、および迅速な分子特性解析を含む、高速顕微鏡検査システムの考えられるいくつかの適用範囲について説明する。これらの特徴は、臨床病理学の適用において重要であるだけでなく、生物学、薬理学、および毒物学の研究においても重要である。さらに、組織サンプルは、適切な撮像光学系を利用できる限り、皮膚や口腔粘膜と同様に、生物内の原位置にあってもよい。

40

【0004】

切除断端評価に関し、手術中に得られる生検の凍結切片の評価については、臨床診療における所定の作業となり得るが、多くの問題を伴う。これらの問題には、配向、包埋、凍結、切断、染色、および切片の染色結果の観察にかかる時間も含まれる。この処理には、各標本につき10分間以上かかることがある。さらに、大部分の凍結標本の品質が最適でない可能性があり、ホルマリン固定パラフィン包埋(「F F P E」)標本の品質より低い

50

ことが多い。その結果として起こる遅延や解釈に関する課題により、手術中の生検または切除断端評価の使用が制限される。その結果、手術中には断端評価が行われない場合、追加の手術が必要になることがある。例えば、乳癌手術の20～40%については、切除断端、またはその近傍に残存する癌、すなわち、最初の外科処置中に検出するのが理想であった癌の沈着物を取り除くために、再手術を行わなければならない。

【0005】

凍結切片の差し替えの必要性についてはよく理解されており、多くの団体や企業がこの分野での取り組みを行っている。技術としては、光散乱、分光法、電気インピーダンス等を含む撮像に基づかない手法の他、線走査共焦点システム、広範囲OCT、多光子顕微鏡検査、が挙げられる。

10

【0006】

生検品質管理も、本開示で扱う分野として挙げられる。生検、特に小さな比較的非侵襲的な針生検においては、注目される組織が含まれていることが重要である。例えば、腎臓の診断においては、針生検に糸球体が含まれている必要があり、癌の診断においては、当然、病巣が適切に採取されている必要がある。組織病理検査、フローサイトメトリー、核酸抽出等の様々な目的のためにサンプルの分割が必要な場合、例えば、組織の分割された各部分に、対象となる細胞または構造が含まれていることが望ましい。さらに、場合によっては、腫瘍と間質とがどのような割合を占めているのかを推定することが重要となる。適切な内容物が確実に含まれるように生検組織を迅速に検査する非破壊的方法が有用であると考えられる。

20

【0007】

取り除いた組織サンプルに対して迅速に診断を行うことも重要である。取り除いた組織の大部分には、最終的な診断を行う前に従来のFFPE処理が施され、ワークフロー次第では、数日間あるいは数週間もの遅延をこうむる。生検時または手術時に診断を行うことができれば、遅延の減少、患者の苦痛の低減、同日の臨床計画の促進、および総費用の削減が可能になる。

【0008】

取り除いた組織サンプルに対して分子特性解析を迅速に行うことも重要である。同様に、癌マーカーまたはコンパニオン診断のための免疫組織化学法または免疫蛍光検査等の多くの分子検査は、最初の組織診断後まで指示されず、さらに数日から数週間の遅延を招く。同時または続いて行われる迅速な分子染色に伴う形態確認が可能な顕微鏡システムがあれば、組織に基づくすべての必要な情報を同日中に生成することができるため、患者にとって非常に有益であり、提供者にとっては費用の削減となる。

30

【0009】

ローレンス・リバモア国立研究所とカリフォルニア大学デービス校が以前行った研究では、生体内での撮像における適用を含む、上述した課題に取り組むための新たな撮像方法が開発された。この共同研究の結果を示す特許が、Demos et al.による米国特許第7,945,077号「組織内のミクロ構造および細胞の生体内撮像用ハイパースペクトル顕微鏡」である。Demos(ローレンス・リバモア・ナショナル・セキュリティ,エルエルシー所属)による米国特許第8,320,650号「組織の生体内スペクトル微小撮像」も、組織のミクロ構造および組織の生体撮像に関する。上記2つの特許は、参照することにより本開示に援用される。上記2つの米国特許に記載された技術により、未処理の組織標本における、細胞規模での組織の構造および構成の可視化が可能となる。この撮像技術では、2つの物理的機構または特性が利用される。1つ目は、組織に表面的にのみ透過する紫外線の使用である。より具体的には、組織の種類や波長に応じて、紫外線が約数マイクロメートル～数十マイクロメートルのみ透過する。その結果、この表面組織層で生成される蛍光信号を、顕微鏡の被写界深度と同等の厚さ内に含めることができる。斜角照射も、任意の波長での励起の光子の透過深度を制限する方法として使用される。透過深度は、その深度に到達する光の量が光の入射量の $1/e$ (または、10%等の所定の部分的量)となる深度とする等、様々な方法で規定することができる。

40

50

【 0 0 1 0 】

2つ目の主要な物理的機構または特性は、分析される組織の細胞区分における天然蛍光物質の使用である。自然の「染色」方法を実現する、細胞区分に含まれる天然蛍光物質（トリプトファン、コラーゲン、エラスチン、NADH等）の濃度には十分なばらつきがある。さらに、造影剤の放出に基づく画像を得ることができ、当該画像を天然蛍光物質の画像と組み合わせることで、追加の分子情報を得ることができる。

【 0 0 1 1 】

本開示の方法は、1)画像取得のための天然組織蛍光分子および外因性染料や標識の使用、2)短時間での画像取得(ミリ秒オーダー)、3)手持型装置を含む幅広い装置設計への組み込みの容易化等のいくつかの機能を提供する。重要なことであるが、本開示の方法は、従来使用されていた技術と比較して、非常にシンプルで安価である。これらの点が、他の新しい技術と比較して重要な利点である。

10

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 2 】

その結果、臨床において、生検が行われた人間および動物の組織に対して、凍結切片評価を行う必要性を低減または排除するシステムおよび方法が依然として必要とされている。より詳細には、時間や費用がかかる比較的大きな組織サンプルの凍結および物理的な切片化が不要で、手術中の生検および切除したばかりの組織サンプルの少なくともいずれかの切除断端評価に適したシステムおよび方法であって、組織サンプルの評価、診断、切除断端分析にさらに役立つ、従来の蛍光染色液および標識とともに使用するのに適したシステムおよび方法が必要とされている。動物研究の分野において、身体機能の基本的な理解のために病気の発現や進行を研究するため、創薬および他の領域で、組織標本の評価を迅速かつ安価で実施可能な方法であり、従来の時間のかかる技術的に困難で比較的高価な組織病理評価が不要となる計測が必要とされている。本明細書で開示されている発明は、上記の多くの必要性に対応するものである。

20

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 3 】

一態様において、本開示は、組織を分析する方法に関する。上記方法は、組織サンプルを取得する工程と、上記組織サンプルを、組織または細胞成分に選択的に蓄積する蛍光染料または蛍光標識分子プローブを含む1つ以上の蛍光物質に晒す工程と、を含んでもよい。約200nmから約400nmの波長の1つ以上の紫外線光源を上記組織サンプルの表面に照射するために照明励起光源を使用してもよい。上記波長は、上記組織サンプルにおける紫外線の透過が、表面からの選択された深度の近傍のみに制限されるように選択されてもよい。上記組織サンプルを撮像するために顕微鏡光学システムを使用してもよい。1つ以上の画像を記録するため、上記顕微鏡光学システムから光情報を受け取る画像取得システムを使用してもよい。分析のために上記画像の処理および表示を行うため、上記画像取得システムと通信する表示システムを使用してもよい。

30

【 0 0 1 4 】

他の一態様において、本開示は、組織サンプルを分析するシステムであって、上記組織サンプルは、組織または細胞成分に選択的に蓄積する蛍光染料または蛍光標識分子プローブを含む1つ以上の蛍光物質に晒された組織サンプルであるシステムに関する。上記システムは、紫外線を上記組織サンプルの表面に照射するように構成された照明励起光源を備えてもよい。上記照明励起光源は、上記組織サンプルにおける紫外線の透過が、表面からの選択された深度の近傍のみに制限されるように選択される波長を有してもよい。上記組織サンプルに関する光情報を提供する顕微鏡が備えられてもよい。上記顕微鏡より提供された上記光情報から1つ以上の画像を生成する画像取得システムが備えられてもよい。分析のために上記1つ以上の画像の処理および表示を行うため、上記画像取得システムと通信する表示システムが備えられてもよい。

40

【 0 0 1 5 】

50

本明細書の記載により、適用性のさらなる範囲が明らかになるであろう。上記記載および具体例は、説明の目的で挙げられているにすぎず、本開示の範囲を限定するものではないことが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0016】

本明細書で説明する図は、説明の目的で挙げられているにすぎず、決して本開示の範囲を限定するものではない。

【図1】本開示の方法を実施するためのシステムの一例のハイレベルブロック図である。

【図2A】標準的な既製の組織学的エオシン液に短時間晒され、405nm（青色光、可視域）および275nm（紫外線）で励起され、図1に示される顕微鏡システムを使用して撮像された、未固定の子羊の腎臓の同じ領域を示す一对の画像である。上記405nmの励起光は、上記組織内に約数十ミクロン透過し、複数の細胞層から発光された。上記275nmの励起光は、はるかに浅く透過し、上記組織の表面に最も近い小管が識別可能となった。

【図2B】作動距離が長いレンズおよび自動xyz顕微鏡ステージを使用して10倍で撮像された、エオシンで着色した子羊の腎臓（図2Aと同じサンプル）の10倍に拡大した領域の合成写真である。上記合成画像の個々のパネルは、示される合成写真を作成するために、平面化され、自動的に連結されている。上記小管および集合管が厳密には同一平面上にはないために、上記小管および集合管の外観は立体的であり、斜角照明が、立体的な外観を示す影を作る。また、陰影形状解析（Shape from shading）ソフトウェアは、特に追加の励起角度により、立体定量データを生成し、所望の画像平面の上下の領域を強調または排除することができる。

【図3A】標準的な透過光顕微鏡で観察した、従来通りに固定、着色されたマウスの心筋の画像である。図3Bは、エオシン、およびDAPIといった細胞核染色剤で着色され、LEDにより275nmを中心とする励起光で励起された新鮮なマウスの心筋組織を示す。上記画像は、上記システムを使用して10倍の倍率で撮像され、エオシンおよびDAPIの帯域は、適切な発光帯域フィルタを使用して別々に収集された。結果として得られた上記画像は、伝統的な明視野透過H&E染色を模して再度着色された。挿入部分は、細胞核の特徴が視覚化できることを示す。

【図4A】上記のようにエオシンおよびDAPIで着色し、275nmで励起され、より低い倍率（5倍）で撮像された正常な乳腺小葉および周辺組織の画像を示す。上記組織は、ホルマリンで固定されたが、切片化されておらず、上記方法が、新鮮な組織だけではなく固定の組織にも適用可能であることを示している。上記画像は、標準的なH&E明視野着色を模して再度着色された。図4Bは、未固定（新鮮）で、切片化されておらず、DAPIおよびエオシンで着色、撮像され、H&Eを模して再度着色された胸の間質および脂質（10倍）を示す。挿入部分は、観察できるクロマチンテクスチャ特性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下の記載は、実際は例にすぎず、本開示、適用、用途を限定するものではない。図面全体にわたって、対応する符号は、対応する部分および特徴を示すことが理解されるべきである。

【0018】

伝統的な病理学の方法により、病理学標本は、組織の薄片を標準的な顕微鏡で観察するために、物理的に切断する必要がある。代わりに、組織を光学的に切片化できれば、凍結、または固定およびパラフィン包埋およびその後のマイクローム法が不要になる。本明細書に記載した前述の方法は、安価かつ効率的に厚い標本を光学的に撮像する、米国特許第7,945,077および米国特許第8,320,650に開示されているように、短紫外線（一般的に266nm）励起による、組織固有の組織蛍光生体分子を使用した、組織の斜めの広視野の蛍光撮像を中心とする。本開示は、大きな組織サンプルの凍結や物理的な切片化が不要な、蛍光染色液および標識を使用した新たな方法を開示することによって

、米国特許第7,945,077号および米国特許第8,320,650号の技術内容についてさらに詳しく説明する。そのような染色液および標識は、広く入手可能であり、組織成分、細胞型（良性/悪性を含む）、特定の細胞下区画および外因性病原体に蓄積するように構成され、異なる波長の光を発するため、撮像中に切片化することが可能である。したがって、本開示の方法の特定の面は、従来の組織病理学における組織細胞のFFPE処理による染色と同様である。しかしながら、多くの、場合によっては大部分の蛍光染料が、発光波長帯にかかわらず330nm以下の紫外線領域において励起可能であるという点は、一般的にあまり、またはほとんど理解されていない。本開示は、より深い部分から発生する望ましくない信号成分を減少させる技術だけではなく、撮像されている組織の切片の深度を制御することが可能となる新たな方法を開示することによって、参照することにより本明細書に援用される米国特許第7,945,077号および米国特許第8,320,650号の技術内容をさらに発展させたものである。

10

【0019】

本開示の上記方法により、蛍光組織染料または分子標識に短時間晒す組織調製のみによって、または、最適な組織標識化の必要に応じて、透過性、pH、透過状態、イオン組成等を制御するための、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド、各種アルコール、アセトン、中性洗剤等の固定剤に短時間晒すような他の組織調製方法によって、例えば透明の（溶融シリカまたは石英、サファイア、または紫外線透過プラスチック）窓に対して軽く押し付けた際の、外科生検材料の切断面の評価を行うことができる。標識化は、組織化学的に組織と相互作用する伝統的または非伝統的な染色液を介して行ってもよく、または抗体、アプタマー、または核酸プローブ等の検出用蛍光物質に結合した分子的に特異的な薬剤であってもよい。組織調製および試薬の標識化との相互作用は、数秒から数分で発生可能であり、晒す必要があるのは組織の最も表面の数ミクロンのみであるため、標本の大部分は影響を受けない。

20

【0020】

上記蛍光組織染料は、例えば、エオシンおよび4',6-ジアミン-2-フェニルインドール（「DAPI」）を含んでよい。上記染料は、撮像される組織サンプルの表面にH&E同様のコントラストをもたらすのに役立つ。350nm~200nmのスペクトル域において十分に励起可能であり、350nm~950nmのスペクトル域において有用な発光帯域を有する染料および蛍光物質の更なる例としては、これに限定されないが、エオシン染料類、トルイジンブルーO、メチレンブルー、DAPI、アクリジンオレンジ、DRAQ5、Hoechst33342および33528、カルセイン-AM、プロピジウムヨウ化物、ナイルブルー、ナイルレッド、オイルレッドO、コンゴレッド、ファストグリーンFCF、DiI、DiO、DiD等、TOTO（登録商標）、YO-PRO（登録商標）等、ニュートラルレッド、ニュークリアファストレッド、ピロニンY、酸性フクシン、アストラゾン類染料、MitoTrackerおよび他のミトコンドリア染料、LysoTrackerおよび他のリソソーム染料、サフラニン染料、チオフラビン染料、蛍光ファロイジン、CellMask（商標）、エバンスブルー、SYTOX（登録商標）グリーン等の形質膜染料、およびオーラミン等の感染因子に結合する蛍光化合物を含む。

30

【0021】

さらに、使用できる分子プローブは、これに限定されないが、抗体および関連分子、アプタマー、Somamers（商標）、核酸オリゴマー、LNA、およびその他を含む。これらのプローブは、直接または間接的に蛍光標識と複合体を形成することができ、蛍光標識は、これに限定されないが、カーボンナノチューブ、カーボン量子ドット、有機蛍光標識（フルオレセイン、ローダミン、アレクサ染料、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5等、テキサスレッド、クマリン系蛍光物質、IRDye800、インドシアニングリーン、BODIPY、DyLight染料、オレゴングリーン、フィコエリトリン等）、希土類元素、半導体量子ドット、有機量子ドット、ポリマードット（pDot）、蛍光ナノ粒子（シリカビーズ、ポリマーソーム、ポルフィリン系ミセルおよびリポソーム等）、およびFRET系染色複合体等の標識クラスを含む。

40

50

【0022】

または、上記蛍光信号は、生検、手術、検視または部検の前に患者や動物モデルの生体内に投与される標識の結果として生じ得るものであり、その後、システム10を使用して検知することができる。

【0023】

または、例えば、好適な温度および酸化特性を有する組織培地中に組織を成長可能な状態で培養し、薬剤を活発に吸収または適切に処理する細胞内で蛍光標識を生成する薬剤に当該組織を晒すことで、生体外機能標識化を発生させることが可能である。そして、これらの生体外で標識化された組織は、システム10を使用して検査することができる。

【0024】

図1には、本開示の一実施形態に係るシステム10が示されている。システム10は、参照することによりその技術内容が本願に援用される米国特許第7,945,077号に記載のシステムに類似していてもよい。システム10は、組織サンプル14に紫外線を照射する紫外線(UV)照明光源12を備えていてもよい。紫外線光源12は、1つ以上のLED、波長固定発光または波長可変発光のレーザ、スペクトル選択可能な連続レーザ、従来のまたはレーザ点火アーク灯、またはクリプトン臭素エキシマランプ、または所望のスペクトル域の十分な明るさが得られる他の光源を含む光源のいずれかであってもよい。

【0025】

上記組織サンプルは、励起光を透過する無蛍光/低蛍光窓16の上または下へ軽く押し付けられてもよく、または窓16無しで直接撮像されてもよい。さらに、生検標本の4面を容易に取得するため、上記組織は、紫外線透過性プラスチックから成る、場合によっては使い捨て可能な、横断面が長方形のキュベットに導入される。上記組織は固定されて配置されるため、4つすべての撮像面が、一致する組織表面と直接接触するはずである。4面すべてを撮像するため、キュベットを手動または自動で再配置してもよく、または、鏡を使用した他の光学装置により、例えば、サンプルを移動させることなく2つ以上の面を撮像することが考えられる。他の組織処理方法を使用してもよい。少なくとも1つの撮像カメラ18a、例えばCCDカメラが、画像取得システム18の一部を形成し、当該撮像カメラ18aは、(光学システムとして機能する)好適な顕微鏡20によって撮像される組織サンプル14の画像を記録するために作動する。画像取得システム18は、以下で詳しく説明するデジタル差分画像処理サブシステム18bを備えていてもよい。

【0026】

多くの異なる蛍光染料を350~220nm範囲の紫外線で励起することができるため、一度に複数の薬剤を使用して染色すること(マルチプレクシング)が可能である。例えば、DAPIとエオシンは、両方が含まれていてもよく、青色および緑色範囲の信号を生成する。赤色に発光する別の染料または標識を加えることにより、3つ目の信号が得られる。または、カメラ18aは、生成された発光の異なる色を撮像可能なカラーカメラであってもよい。追加の標識がある場合、または従来のカラー(RGB)カメラで得られるものよりも優れた、名目上の赤、緑、および青の標識の切片を所望する場合は、1つ以上のモノクロカメラ、またはモノクロカメラとカラーカメラとの組み合わせを、総称的にカメラ18aと称してもよく、組織サンプル14の画像を同時または順次取得するために使用されてもよい。必要に応じて、所定のスペクトルの出射光のみを透過するように構成された1つ以上の光学フィルタ19を組み込んでもよい。そのようなフィルタ19は、従来のフィルタホルダに配置してもよいし、センサの個々の画素を覆うように配置してもよいし、光照射野技術を採用した、マイクロレンズを有するスナップショット撮像システム、または他の単一取得設計に組み込んでもよい。または、波長可変フィルタベースのマルチスペクトル撮像システムを採用してもよい。より一般的には、スペクトルおよび空間に関する情報を生成できる任意の励起および発光側システムの少なくともいずれかを使用できる。

【0027】

カメラ18aは、必要に応じて、処理を行うために画像データをデジタル差分画像処理

10

20

30

40

50

サブシステム 18b に送信し、それによって得られる画像が表示システム 22 に送信される。カラー分離またはスペクトル分離の後、または他の処理を実施後、異なる標識の分布および存在度パターンに対応する個別の成分画像を生成することができる。または、実際のまたは疑似的な着色により、組み合わせた染料または蛍光物質情報を含む融合された単一画像を生成して提供することができる。表示システム 22 としては、ラップトップコンピュータ、電子タブレット、スマートフォン、またはデジタル画像を表示可能な任意の他の装置が適しているが、この例においては、表示システム 22 は、モニタ付きデスクトップコンピュータシステムにより形成されている。上記の取得画像は、検査のため、表示システム 22 からリモート設備 24 に送信されてもよい。または、上記画像はシステム 10 から直接（すなわち、表示システム 22 を迂回して）リモート設備 24 に送信されてもよい。10
どちらの場合も、上記取得画像は、天然組織蛍光を使用して取得された後、および上記組織が選択された蛍光染料または分子標識に晒された後の少なくともいずれかの後、訓練を受けた人員によってほとんどすぐに検査されてもよい。上記取得画像は、表示システム 22 の好適な記憶システム、およびリモートデジタルメディア記憶サブシステムの少なくともいずれかに保存されてもよい。さらに、以下で簡単に説明するように、上記画像は、自動または半自動コンピュータプログラムを使用して解釈または定量化されてもよい。

【0028】

本開示のシステム 10 および方法の特有の利点は、本明細書に記載された波長の光がタンパク質や核酸等の組織成分に強力に吸収されることである。その結果、励起光の大部分は、組織サンプルの表面から細胞 1 個分または数個分の深度のみ透過する。これにより、物理的な切片化が不要となる。別の重要な利点は、本開示の方法により採用される紫外線スペクトル領域の光によって、実質的にすべての蛍光染料を励起することができることである。これにより、分子プローブを含む複数の光造影剤の使用が著しく容易になる。20

【0029】

別の利点としては、照明が軸上ではなく斜角で行われ、3次元の情報を提供する、陰影または影の情報を提供することが挙げられる。この光学的効果は、認知できる形状または深度を知覚させるために直接取得した画像において明らかであり、または、計算により取得した深度情報または追加の軸切片化、または他の解像度向上のために、例えば断層撮影法等の様々な数学アルゴリズムに入力することができる。30

【0030】

組織サンプルの凍結および物理的な切片化が不要な方法と組み合わせて、蛍光染料およびプローブを使用することにより、迅速な撮像が可能となり、一般的に広視野で高解像度の画像を 1 分以下で作成することができる。さらに、直接標識化された抗体または核酸プローブによって上記組織の染色（RNA 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（「Turbo RNA FISH」）等のように迅速なハイブリッド形成が可能）を行うことも可能であり、特異性染色と非特異性染色とは、対象プローブと対象でないプローブとを同時に使用することによりすぐに区別できる。治療および適切な光学的後処理の手順により、病理学者に許容される画像品質の実現が可能となる。当該品質は最初の診断作業においても適している。本願のシステム 10 および方法は、上記の他の手法と比較して安価である。その理由の 1 つとしては、上記方法の実施には、レーザまたはダイクロイックミラーさえも不要であることが挙げられる。この範囲の紫外線は、従来の顕微鏡光学系では透過されないため、励起阻止フィルタが不要になる。場合によっては、本開示の上記方法は、1 つ以上の紫外線 LED 照明光源、顕微鏡レンズ、好適なカラーカメラ、および好適な表示 / 演算システムのみを使用して実施してよい。好適なオプトメカニクスによれば、携帯電話のカメラでも有用なセンサを提供することができ、安価で現場に配置可能なシステムへの一体化が可能であることは明らかである。40

【0031】

本開示のシステム 10 および方法は、さらに組織標本の撮像の最適化の方法についても示す。当該方法においては、広く入手可能な造影剤を使用し、組織サンプルの凍結や物理的な切片化を伴う従来の方法で行う場合と比較して、拡大した標本に対して高品質な走査50

を短時間で行うことができる。本開示の技術内容を実施する際には、複数の技術的な検討事項について考慮すべきである。検討事項としては、これに限定されないが、a) 適切に最適化された造影剤および染色方法の選択および/または発見、b) 計測にかかる費用を最小限にする方法、c) 大きな標本の撮像に要する時間を最小限にする方法、d) 特定のタスクを実施する計測および構造の選択、e) 画像の保存、送信、および処理、およびf) 撮像深度の制御方法を含む。次に、本発明に係る上記の検討事項のそれぞれを、上に挙げた順番で説明する。

A) 適切に最適化された造影剤の選択および/または発見

使用される上記造影剤は、病理組織学的診断または特性解析に適した組織のミクロ構造および構成の可視化を可能にするために、例えば、pH、イオン強度、細胞および細胞下構造の透過性、水和状態、溶媒、タンパク質および核酸の構造および架橋結合、抗原の入手可能性等を変更することにより、新鮮な組織標本の細胞下および細胞内区画の染色（染色を最適化する調整溶液に短時間晒す、または晒さないこと、が可能であればよい。上記造影剤は、励起に使用される紫外線スペクトル域で吸収し、可視スペクトルのようなより長い波長で発光すればよい。上記造影剤は、処理時間を最小限にするため、できるだけ早く物理的に晒して組織を染色すればよい。上記造影剤は、実質的に、組織のマクロ構造またはミクロ構造を変更したり損傷したりすべきではない。造影剤を含む溶液に組織を晒す時間は最適化してもよい。

【0032】

上記造影剤は、タンパク質を凝固または沈殿させ、アルコール、洗剤、またはホルムアルデヒド等の、細胞を透過性にする成分を含んでよい。これにより、組織の上端の数ミクロンに対してのみ作用すればよい。作業に数秒しか要さない。選択された造影剤は、撮像技術および適した後処理とあわせて、現在の診断用画像に類似するH & E同様の画像であって、現役の外科病理医によって判断されるように主観的な品質基準を満たす画像を生成することができる。しかしながら、結果として得られる画像は、たとえ光学的に高品質であっても、凍結された切片またはFFPE技術により得られた画像とは異なっているかもしれない。その理由は、これらの方法のよく知られている人工物（退縮、細胞核除去、クロマチン凝集等）が、凍結、固定、パラフィン包埋を行っていない標本には存在しない可能性があるからである。さらに、分子プローブの結合および検知を最適化する方法は、抗原、遺伝子、または発現したRNA分子の可視化に必要となるであろう。迅速なHER2タンパク質の検知、例えば、TURBO FISHを介した様々なRNA分子の検知を可能とする、直接標識化された抗体を使用する迅速な技術がある。

B) 計測にかかる費用を最小限にする方法

計測の費用は、撮像および処理方法に直接関係するが、撮像された画像の品質および診断に必要な情報量にも直接関係している。このような一連の動作パラメータ内において、費用を最小限にするために、好適な計測を選択することができる。そのような費用は、顕微鏡の対物レンズおよびフィルタを含む光学的要素の取得費用、光源の費用、カメラや検出器の費用に依存する。これらの部品の入手可能性および費用に応じて、特定の計測構造を設計することができる。具体的には、1つのモノクロカメラを使用して、複数のスペクトル画像を得ることができるが、大きな標本の走査により長い時間がかかる。一方、大きな標本の走査にかかる時間を最小限にするために、明るい光源とあわせて複数のカメラを使用することもできるが、計測の費用が増加する。または、解像度および光度が十分であれば、消費者レベルのRGBカメラが適している場合がある。これにより、一度晒すだけで、異なる蛍光成分（内因性または外因性）の発光のフルカラー撮像が可能になる。または、小型レンズアレイおよび設定可能なフィルタ挿入部を有するフィルタピクセルマスクまたは光照射野撮像を使用するカメラ等のスナップショットスペクトルカメラは、一度晒すだけで、複数の波長画像を生成することができる。

【0033】

大きな標本は、a) 図2Bに示すように、より小さな切片の高解像度の範囲に照明が照射された画像を連結する、b) 走査方法によりポイントごとに紫外線を走査する、または

10

20

30

40

50

c) 線走査のために紫外線の線を使用する等の、様々な方法によるこの一般的な手法で撮像することができる。例えば、構造化照明および単一画素検出器を使用する圧縮センシングも適している可能性がある。または、高NA低倍率レンズ、高画素数カメラ、および複数の画像からの情報を使用して高品質のレンダリングを生成する計算によるアプローチ等の、広視野で観察しながら解像度を保持できる方法を使用することができる。サンプルの移動は、必要に応じて、検出器アセンブリのサンプルホルダモジュールをモータ付ステージに取り付けることによって容易にすることができる。または、サンプルまたはステージを手動で移動することができ、結果として得られる画像を自動で連結することができる。そのため、適切な計測の選択は、組み立て時の部品の取得費用だけではなく、様々な技術的な仕様に基づいている。

10

C) 大きな標本の走査に要する時間を最小限にする方法

走査時間は、検出システムの感度、レンズシステムの開口数、任意のフィルタの透過効率、励起強度、カメラおよび検出器の少なくともいずれかの量子効率、および造影剤の濃度等の計測に関連する多くのパラメータに依存している。造影剤の光退色前の最大励起強度、または実際の組織の光損傷または組織の焼灼等も限定要因である。

【0034】

必要な空間分解能が、走査速度において重要な役割を担っている。画像取得中の信号対雑音の比率は、画像品質が低下しない程度に十分高く保たれていればよい。各場所についての異なる発光帯域の複数の画像が必要になる可能性があるため、複数のカメラまたは他の並行画像取得方法を使用することにより、走査速度をより速くすることができる。または、標準フルカラー(RGB)センサを使用して、晒すことが必要な回数を減らすこともでき、または様々なスナップショットマルチスペクトル撮像技術を採用することもできる。

20

【0035】

D) 特定のタスクを実施するための計測および構造の選択

上述のセクションA、B、およびCで挙げた様々な技術的検討事項に関する説明では、本開示のシステムおよび方法の技術内容を実施するために使用できる器具の様々な可能な構造および種類に注目した。これらは、撮像装置および走査の速度や方法に関連する。以下の技術的検討事項F)で扱う照明形状から別の側面が生じる。概して、上記撮像方法には、照明、集光およびフィルタリング、画像取得、大きな標本の走査、複合デジタル画像の作成、画像の分析および向上のための装置が必要となる。特に、低価格での実装は、世界の健康用途、携帯電話または類似するセンサの強化、および演算および通信プラットフォーム、に関連する資源の乏しい状況で使用するために設計することができる。

30

E) 画像の保存、送信、および処理

上記サンプルの画像は、直ちにデジタル化され、様々な種類のデジタル記録媒体に保存されてもよい。画像ファイルは、遠隔診察が容易になるように現在および未来の情報技術を使用して、直ちに送信されてもよい。機械学習(または他の様相)による画像の分割、分類、および定量化の能力を追加することにより、本開示のシステムおよび方法の性能および有用性が向上し、自動診断をもたらすのに役立つ可能性がある。

40

F) 撮像深度の制御方法

撮像深度の制御は、診断分析用に適した品質の画像を生成するために特に重要である。現在の組織病理学分析における撮像深度は、染色および顕微鏡での観察を実施する前に、処理済みの組織の切片を切断することで制御される。本開示のシステムおよび方法によれば、高品質の画像を得るために、上記サンプルは、平坦面がクリアな光学サンプル支持体に並置できるように切断しなければならない可能性があるが、切片化の実施は、組織サンプルを物理的に薄く切るのではなく、光学的に行うことができる。従来のカバースリップ同様に、上記サンプル支持体表面は、最適な画像品質を得るために適した厚さと屈折率を有している必要がある。照明光源12からの励起光子の組織サンプル14への透過深度を光学的に制御することは、システム10の重要な特徴である。最適な透過深度は多少変わる可能性があるが、現時点での好ましい透過深度は約5~25マイクロメートルであり、

50

より好ましくは約10マイクロメートルである。この深度は、ある比率で照明の減衰が起こる、組織サンプル14の表面からの距離を表す。しかしながら、この深度よりも深い地点まで到達できる光子があり、そのようなより深く透過する光子により、意図する撮像区域（すなわち、表面とその表面下約10マイクロメートルとの間の区域）の外にある信号が提供されるであろう。選択された撮像深度よりも深い層からのそのような光子により生成された蛍光信号を除外することが有用である場合がある。

【0036】

本願で説明した適用と同様の効果をもたらす別の機構、すなわち、特定の組織成分または分子標的を強調するための蛍光造影剤の使用も行われる。具体的には、紫外線によって組織を励起することにより、近紫外線の自己蛍光が生成される。上記蛍光造影剤は、紫外線励起および近紫外線自己蛍光の両方により、励起可能となる。近紫外線自己蛍光は、組織内で生成され、全方向に等しく向けられるため、励起が多少追加され、そのため、より深い部分から組織への励起が引き起こされる。

10

【0037】

本開示のシステムおよび方法は、上記のすべての検討事項に対応している。簡単にするため、以下では、2つの主な問題であるA)撮像区域の深度の制御、およびB)画像処理による不要な信号成分の除去について説明する。

【0038】

上記撮像区域の深度は、紫外線照明励起光源12からの信号の励起波長を使用して、制御することができる。この撮像方法では、透過深度を浅くするため、紫外線励起が使用される。しかし、撮像区域の正確な深度を制御する必要がある場合は、励起波長が適した波長にぴったり合っている必要がある。撮像区域の深度は、通常、励起光の波長がより短くなるのと同様に減少する、または保持される。これは、約370nm下～約240nmの場合に当てはまる。約240nm未満の場合は、波長がさらに短くなり、透過深度が激減する。したがって、所定の透過深度を実現するため、適した励起波長を選択することができる。これは図2Aに示されている。

20

【0039】

撮像区域の深度を制御するために使用できる別のパラメータとしては、励起光の入射角が挙げられる。法線入射、すなわち紫外線照明励起光源12を組織サンプル14の撮像された表面に応じた平面に対して約90°で角度26に配置することにより、斜角入射よりも深く透過することが可能となる。この配置は、図1の照明励起光源12で示される。この場合、励起光は、組織サンプル14の表面に対して90°で組織サンプル14を照らす撮像装置（例えば、顕微鏡20）の対物レンズを通過してよい。組織サンプル14の上面に対して斜めの角度で配置された照明励起光源によれば、図1に照明励起光源12により示されているように、組織サンプル14の表面に対して90°で配置された照明励起光源12よりも、透過深度は小さくなる。上記透過深度は、入射角26が増えるにつれて、減少する（すなわち、組織サンプル14の表面に対して90°に近づく）。入射角26を慎重に制御することにより、組織サンプル14に対する紫外線の透過深度を比較的正確に選択することができる。

30

【0040】

画像処理は、不要な画像成分を取り除くためにも使用できる。このような成分は、焦点外および/または撮像区域外の画像成分であってもよい。これらの不要な成分を取り除くため、適したデジタル差分画像処理サブシステム22a（図1）を介して実施される差分撮像方法を使用することができる。また、「差分」という用語は、不要な信号成分を抑制しつつ、特定の信号成分を向上させるサブシステム22aによって実施してもよい、1つ以上の撮像動作を示す総称として使用されている。そのような動作は、これに限定されないが、画像減算、画像除算、または、画素毎の動作または他の手段による他の種類の数学的画像処理を含んでもよい。

40

【0041】

この種の画像処理では、焦点信号と不要な信号成分との相対寄与が異なる画像が少なく

50

とも2つ必要となる。使用可能な複数の異なる方法を次に挙げるが、本明細書に記載の方法に類似した、同じロジックを提示する他の方法を構築してもよい。

【0042】

上記2つ以上の画像は、以下を使用して取得してもよい。

【0043】

1) 撮像のための、同じ発光スペクトル帯域を使用する2つ以上の励起波長またはスペクトル帯域。

【0044】

2) 同じ励起波長を使用する2つ以上の異なる発光波長またはスペクトル帯域。

【0045】

3) 撮像のための、2つ以上の励起波長またはスペクトル帯域および2つ以上の異なる発光スペクトル帯域。

【0046】

4) 同じ励起波長またはスペクトル帯域を使用する2つ以上の光励起入射角。

【0047】

5) 異なる励起波長またはスペクトル帯域を使用する2つ以上の光励起入射角。

【0048】

6) 撮像のための、同じ発光スペクトル帯域を使用する2つ以上の光励起入射角。

【0049】

7) 撮像のための、異なる発光スペクトル帯域を使用する2つ以上の光励起入射角。

【0050】

8) 撮像のための、発光の同じ偏光状態を使用する、励起の2つ以上の偏光状態。

【0051】

9) 撮像のための、発光の異なる偏光状態を使用する、励起の1つの偏光状態。

【0052】

画像処理および数学的な再構成の少なくともいずれかを介して、任意により深いまたは表面的な信号を除外するために使用可能な画像を提供するように構成された、励起光の様々な入射角および様々な回転角の少なくともいずれかを使用して撮像される画像の配列。

【0053】

10) さらに上記の組み合わせ。

【0054】

11) 様々な空間変調照明(励起)パターンを使用して取得した2つ以上の画像。

【0055】

12) 画像処理および数学的な再構成の少なくともいずれかを介して、任意により深いまたは表面的な信号を除外するために使用可能な画像を提供するように構成された、様々な空間変調照明(励起)構造を使用して撮像される画像の配列。

【0056】

13) 画像処理および数学的な再構成の少なくともいずれかを介して、任意に、より深いまたは表面的な信号を除外するために使用可能な、顕微鏡システムによって組織表面の上下で異なる深度に焦点が当てられる画像の配列。

【0057】

図2Bの画像で示すように、陰影形状解析(Shape from shading)分析を含む、上記画像からの追加情報は、光軸の周りに放射状に配置された複数の斜照明光源を使用して取得できる。

【0058】

図3には、マウスの心臓組織の画像が示されている。図3Aでは、紺色の丸の部分が細胞核を表し、ピンク色の部分が心筋収縮要素を含む細胞質を表す。ホルマリンで固定され、FFPE処理されたヘマトキシリンおよびエオシン染色(H&E染色)組織の標準的な組織学的切片の写真である。これは、医療診断目的で、組織標本に対して機械で切片化および染色を行う、周知の、現在最も広く使用されている方法を示す。この周知の処理では

10

20

30

40

50

、病理学者が上記組織サンプルを顕微鏡で観察できるようになるまでに、（一般的な組織学研究室のワークフローによる）約24時間の処理および操作の時間が必要となる。図3Bに示す組織標本の画像は、蛍光染色液および標識とあわせて、本開示のシステム10および方法を使用して得られた。図3Aの組織標本は、エオシンおよびDAPIを含む溶液に30秒間浸した。そして、2つの蛍光画像は、顕微鏡（例えば、図1のレンズサブシステム20）で、450nmおよび550nmを中心とするフィルタを使用して、選択的にそれぞれDAPI（細胞核タンパク質に結合）およびエオシンの位置をマッピングすることにより得られる。市販のソフトウェアを使用して、従来の組織病理学のH&Eの外観を模した合成画像（図3B）が作成された。図3Bの画像は、組織標本の染色を含め、約1分間で得られた。図3Bの画像はデジタル画像であるため、有線または無線デジタル送信サブシステムを介して遠隔地の診断施設または病院に直ちに送信できる。無線通信回線が使用される場合は、世界のいずれの場所にいる病理学者に対しても事実上すぐに画像を送信することができる。さらに、上記組織標本は、様々な溶液に短時間晒すことによる表面的な染色または他の表面の修飾は別として、実施される分析においては、撮像用の平面を得るために行われ得る二等分以外に物理的な切片化が不要となるため、損傷することがない。

10

20

30

40

50

【0059】

図3Bにおいて、より厚い組織切片を撮像しているため、より高い濃度の細胞核102が画像内に見られる。図3Aでは、組織標本の厚さ約5 μ mの切片の画像を示しているが、図3Bの画像は、組織標本の最上層の約20 μ mの撮像深度から得られる。改良型の光学切片化によれば、例えばより短い波長の照明を使用して、本開示のシステム10および方法により、迅速な組織評価のための従来の組織病理学方法を使用して生成された画像と質的に同様の画像を生成することができる。凍結切片の実験計画を使用する従来の方法では、一般的に人工物の凍結および他の問題によって、より品質の低い画像が得られること、実施に約10～20分間かかること、検査した組織標本が物理的に損なわれること、に留意することが重要である。

【0060】

図4Aおよび図4Bは、本開示のシステムおよび方法を使用して取得した組織サンプルの別の画像を示す。図4Aは、乳腺小葉および周辺組織（倍率5倍）を示す。上記組織は、あらかじめホルマリンで固定されたが、切片化されていない。図4Bは、切片化されていない胸の間質（ほぼ脂質）（倍率10倍、未固定（新鮮））を示す。図4Bの組織は、DAPIおよびエオシンで着色され、撮像されて、H&Eを模して再度着色された。図4Bの挿入図は、観察できる良好なクロマチンテクスチャ特性を示す。無傷の脂肪球が依然として存在しているため、凍結された切片または着色されたFFPEスライドとは外観が異なる。

【0061】

このように、本開示のシステムおよび方法によれば、標準的なFFPEに基づく組織学、遺伝物質の抽出、または他の手順を含む、後処理プロセスに使用可能な組織標本の完全性に対する影響が限定的である方法により、組織標本の分析および評価をはるかに迅速に行うことができる。

【0062】

様々な実施形態について説明したが、当業者は、本開示から逸脱せずに行われる修正や変更を認識するであろう。上記例示は、様々な実施形態を示すものであり、本開示を限定するものではない。したがって、本明細書および特許請求の範囲は、関連する先行技術を考慮して必要な限定のみにより、自由に解釈されるべきである。

G) 画像取得のための標本の処理方法

本発明の技術内容における撮像においては、顕微鏡システムに対して、サンプルの比較的平坦な面を提示することが非常に好ましい。この平坦面は、様々な手段により実現できる。その手段としては、これに限定されないが、以下のものが挙げられる。

a) 表面がもともと平坦であってよい。

b) サンプルの撮像された小切片それぞれを、画像取得のために（画像平面と比較して）平らな方向に提示できるように、サンプルを複数の方向に回転させて平行移動させることができるホルダーにサンプルが付着している。

c) 上記標本が、画像取得のために、励起光の透過および生成された信号の送信を可能にする平坦な光学面に接触させられるが、平坦な面を生成するのに十分な圧力（自身の重量、サンプルの重量、または外部の重量または圧力を追加的に加えることによる）が加えられる。

d) 上記サンプルは、標本のほぼすべての露出面を覆う標本の複数の平坦面を示すため、画像取得のために、励起の透過および生成された信号の送信を可能にする、表面が平坦または場合によっては湾曲した（キュベット等）適した容器内に挿入される。

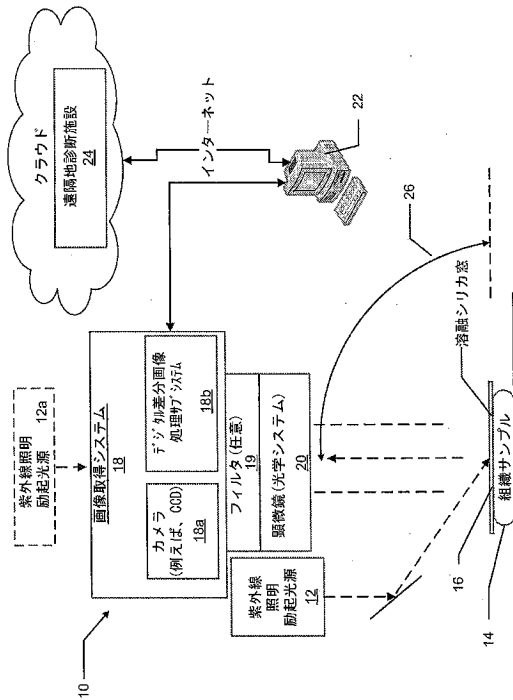
10

【0063】

平坦面を生成するサンプル支持体材料は、石英、熔融シリカ、サファイア、またはTPX（登録商標）ポリメチルペンテン等の紫外線透過プラスチックを含む紫外線透過材である。上記標本は、スペクトルおよびスペクトル分解能が適切な標本の一連の画像が得られるように、顕微鏡の画像平面に対して平行移動および回転の少なくともいずれかを実行する。次に、上記画像は、必要に応じて、標本全体または標本の切片の高解像度の画像が得られるよう重ねられてもよい（画像連結）。

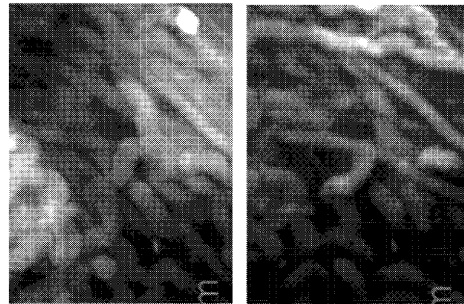
【図1】

図1



【図2A】

FIGURE 2A



【 図 2 B 】

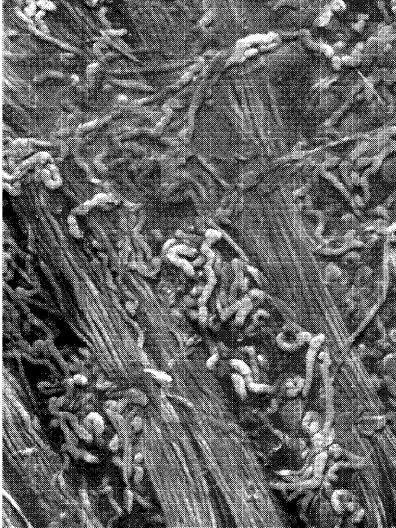


FIGURE 2B

【 図 3 B 】

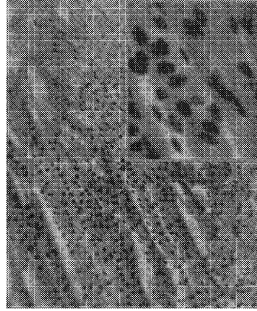


FIGURE 3B

【 図 3 A 】

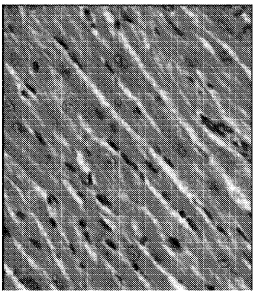


FIGURE 3A

【 図 4 A 】

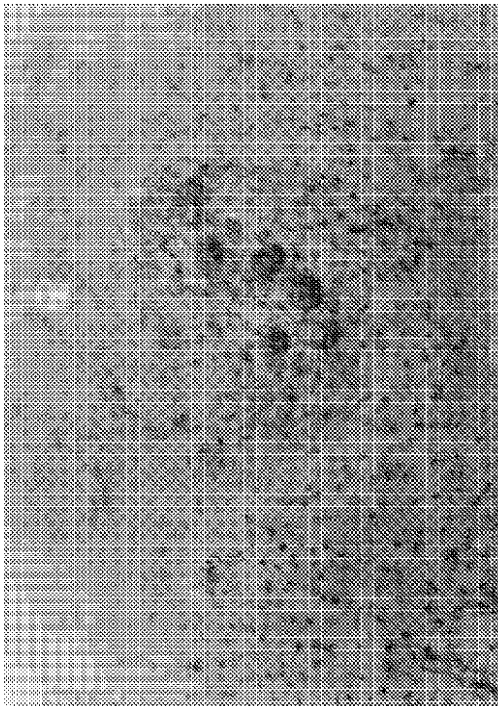


FIGURE 4A

【 図 4 B 】

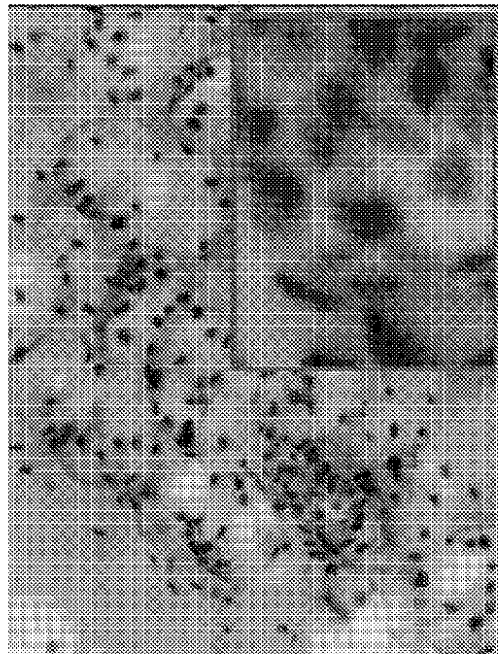




FIGURE 4B

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/048519
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
G01N 21/64(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, C12M 1/34(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 21/64; C12Q 1/02; A61F 5/37; A61B 10/00; A61B 5/1455; A61F 5/058; A61B 5/00; C12Q 1/68; C12M 1/34		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: tissue, fluorophores, UV, penetration depth		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011-0224574 A1 (SADLER et al.) 15 September 2011 See abstract, paragraphs [0025]-[0071] and figure 2.	1-21
Y	WO 2013-093843 A1 (ORFIT INDUSTRIES) 27 June 2013 See abstract and pages 4-10.	1-21
A	US 2011-0117025 A1 (DACOSTA et al.) 19 May 2011 See figures 1-4.	1-21
A	US 2009-0137908 A1 (PATWARDHAN) 28 May 2009 See figures 2A-6.	1-21
A	US 2012-0053429 A1 (TREPAGNIER et al.) 01 March 2012 See figures 1-11.	1-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 December 2015 (07.12.2015)		Date of mailing of the international search report 07 December 2015 (07.12.2015)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer KANG, Sung Chul Telephone No. +82-42-481-8405 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2015/048519

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011-0224574 A1	15/09/2011	WO 2010-056945 A2 WO 2010-056945 A3	20/05/2010 12/08/2010
WO 2013-093843 A1	27/06/2013	BE 1020363 A3 CN 104203167 A EP 2793767 A1 HK 1198907 A1 JP 2015-504106 A US 2015-0000679 A1	06/08/2013 10/12/2014 29/10/2014 19/06/2015 05/02/2015 01/01/2015
US 2011-0117025 A1	19/05/2011	CA 2724973 A1 CA 2724973 C CA 2891990 A1 CN 102099671 A EP 2291640 A1 EP 2291640 A4 JP 2011-521237 A JP 2015-057600 A US 9042967 B2 WO 2009-140757 A1	26/11/2009 11/08/2015 26/11/2009 15/06/2011 09/03/2011 05/12/2012 21/07/2011 26/03/2015 26/05/2015 26/11/2009
US 2009-0137908 A1	28/05/2009	US 2014-364745 A1 US 8849380 B2 WO 2009-070370 A2 WO 2009-070370 A3	11/12/2014 30/09/2014 04/06/2009 19/11/2009
US 2012-0053429 A1	01/03/2012	US 2006-0195022 A1 US 6505059 B1 US 7899518 B2 WO 01-60248 A1	31/08/2006 07/01/2003 01/03/2011 23/08/2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02
			C 1 2 M	1/34
				A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 110000338

特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK

(72)発明者 ディーモス, スタフロス ジー.

アメリカ合衆国, 9 4 5 5 0 カリフォルニア州, リバモア, カーネギー ループ 5 4 3 6

(72)発明者 レヴェンソン, リチャード

アメリカ合衆国, 9 5 6 1 6 - 3 1 2 2 カリフォルニア州, デイビス, ブキャナン ドライブ
6 4 0

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 DA06 EA01 FA01 FA02 KA03 KA05 KA09 LA03
2G045 AA24 BB24 CB01 FA16
2H052 AA09 AC04 AC09 AE01 AF14 AF21 AF25
4B029 AA07 BB11 FA15
4B063 QA01 QQ08 QR56 QR66 QS36 QX02 QX04 QX10

专利名称(译)	用荧光剂染色后使用紫外激发通过荧光显微镜控制组织成像深度的系统和方法		
公开(公告)号	JP2017534846A	公开(公告)日	2017-11-24
申请号	JP2017514482	申请日	2015-09-04
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	劳伦斯·利弗莫尔国家安全, LLC 加州大学董事会		
[标]发明人	デーモスタフロスジー レヴェンソンリチャード		
发明人	デーモス,スタフロス ジー. レヴェンソン,リチャード		
IPC分类号	G01N21/64 G02B21/00 G01N33/48 G01N33/53 C12Q1/02 C12M1/34		
FI分类号	G01N21/64.E G02B21/00 G01N21/64.F G01N33/48.P G01N33/53.Y C12Q1/02 C12M1/34.A		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/DA06 2G043/EA01 2G043/FA01 2G043/FA02 2G043/KA03 2G043/KA05 2G043/KA09 2G043/LA03 2G045/AA24 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/FA16 2H052/AA09 2H052/AC04 2H052/AC09 2H052/AE01 2H052/AF14 2H052/AF21 2H052/AF25 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QR56 4B063/QR66 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX04 4B063/QX10		
优先权	14/487997 2014-09-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开涉及分析组织样本的方法。在一种实施方式中，该方法包括以下步骤：获得组织样品，并将该样品暴露于一种或多种荧光团作为造影剂，以增强组织样品的亚细胞隔室的对比度。组织样品暴露于波长为约200 nm至约400 nm的紫外线 (UV) 中，该波长选择为仅穿透组织样品表面以下的预定深度。通过在利用不同图像参数获取的图像之间执行的图像间操作来去除不必要的图像成分，可以提高图像质量。显微镜可以用于使组织样本成像，并且可以使用照相机将图像提供给图像采集系统。图像采集系统可以创建对应的图像，并将其发送到显示系统以进行处理和显示。

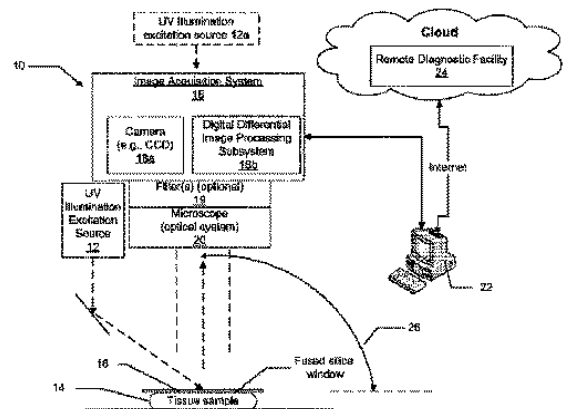


FIGURE 1